Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 259-277

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۲ ص. ۲۷۷-۲۵۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Identification of Bioactive Compounds in the Extracts of Brown Algae Sargassum (*Sargassum angustifulium*) and Padina (*Padina distromatic*) and Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Enzymatic Properties

Kh. Shirani-Bidabadi[1], Sh. Safaeian[2*], R. Mousavi-Nodoshan[3], N. Rahimifard[4]

Received: 2021.10.23
Revised: 2021.11.20
Accepted: 2021.11.24
Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:
Shirani-Bidabadi, Kh., Safaeian, Sh., Mousavi-Nadoshan, R., & Rahimifard, N. (2023). Identification of bioactive compounds in the extracts of brown algae Sargassum (*Sargassum angustifulium*) and Padina (*Padina distromatic*) and evaluation of antimicrobial, antioxidant and enzymatic properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(2), 259-277. http://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.73113.1104

Introduction

Sargassum and *Padina* are two genera of brown algae that are widely scattered in temperate regions. *Sargassum* species are categorized as tropical and sub-tropical brown seaweed which are valuable sources of bioactive compounds including dietary fibers, carotenoids, vitamins, and minerals. These brown algae demonstrate diverse biological activities such as antioxidant, antimicrobial, and anti‑Alzheimer, due to the presence of flavonoids, triterpenoids, flavonoids, sterols, polyphenols, and pheophytine. The genus *Padina* is scattered in many environmental conditions, mainly in the tropical marine waters, and belongs to the family *Dictyotaceae*. Some bioactive components isolated from *Padina* species have been demonstrated hypoglycemic, hypolipidemic, anti-obesity, hepatoprotective, cardioprotective, immunostimulatory, and antimicrobial activities., The aim of this study was to prepare an extract from two species of algae Padina and Sargsum by massaging and ultrasound assisted-methods as well as analyzing their compounds and investigating the antioxidant, antimicrobial and enzymatic properties of the extracts. According to the obtained results, ultrasound assisted method was a suitable method for extraction. This extract can be used as a combination of antioxidant, antimicrobial, anti-Alzheimer's and nitrate reducing agent in food additives.

Materials and Methods

Chemical materials were supplied by Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Germany). The algal species utilized in the current investigation; namely, *Padina distromatic* and *Sargassum angustifolium* were collected from the coastal region of Chabahar bandar, Sistan and Baluchistan Province, Iran. To eliminate all the impurities and extraneous materials, they were washed by using distilled water and then dried at ambient temperature (24-48 h) until the constant weight. Extraction by maceration was compared with the extraction using ultrasonic assisted method. Determination of chemical compounds was parformed using GC-MS device. Investigation of antioxidant properties and total polyphenol and flavonoid content were also performed. The degree of free radical scavenging was done according to DPPH method. Evaluation of antimicrobial effect of algae extracts were the main challenges in our research. *S. aureus ATCC25923, Listeria innocua ATCC 33090, E. coli ATCC 25922 and S. typhi ATCC 6539* were used for antimicrobial test. Determination of minimum growth inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were performed using wells in agar.The enzymatic activity was also determined. In this study, the activity of acetylcholinesterase was investigated using the method introduced by Ellman et al. (1961) and also the activity of nitric oxidase was determined using a kit protocol (Nvand-Iran). Factorial experiment in the form of a completely randomized

1, 2, 3 and 4- Ph.D Student, Associate Professors and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: shilla2462462@yahoo.co.in)
4- Professor, Faculty of Paramedicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2021.73113.1104

design was used to analyze the data. Duncan's multiple range test was used to determine the difference between the means at the 95% confidence level, and SAS software version 2.9 will used for statistical analysis.

Results and Discussion

The current study investigated the antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and anti-Alzheimer’s attributes of two brown algae namely *Padina* distromatic and *Sargassum angustifolium* which were collected from the coastal region of Chabahar Bandar, Iran. The results clearly indicated that the type of algae and extraction techniques used in this investigation highly affected phytochemical compositions, antioxidant, AChE inhibitory, scavenging, and antimicrobial activities. Considering both extraction yield and phytochemical components, extraction by ultrasound assisted method provided better results. Among all algal extracts, UPE presented the highest AChE inhibitory activity, and antibacterial activity and USE presented the highest antioxidant activities, total phenols and flavonoids, reflecting the presence of various bioactive components. The extracts of two various seaweeds utilized in the current study highlighted considerable inhibitory action against four pathogenic bacteria. According to the observations of the antibacterial assay, *S. aureus* was the most sensitive microorganism, while *L. innocua* was revealed as the most resistant bacteria to the extracts of *P. distromatic* and *S. angustifolium*. Further, the chemical components responsible for the antioxidant, AChE inhibitory, and antibacterial power were confirmed by GC-MS analysis. The findings of the current investigation confirmed the potential of the health benefits and therapeutic effect of brown marine algae. Thus, the extract of *P. distromatic* and *S. latifolium* could be an effective supplement to be incorporated into the products’ formulation in the food and pharmaceutical industries as well as in medication to alleviate several disorders such as Alzheimer.

Keywords: Algae, Antimicrobial, Enzymatic properties, Extraction, GC-MS

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲ ص. ۲۷۷-۲۵۹

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 259-277

مقاله پژوهشی

شناسایی ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره جلبک‌های قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum angustifulium*) و پادینا (*Padina distromatic*) و بررسی اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و خواص آنزیمی آن‌ها

خدیجه شیرانی بیدآبادی[۱] - شیلا صفاییان[۲]* - رضوان موسوی ندوشن[۳] - ناهید رحیمی‌فرد[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳

چکیده

جلبک‌های دریایی جز منابع غنی گیاهی محسوب می‌شوند که در طب سنتی کاربردهای گوناگونی دارند. هدف از این مطالعه عصاره گیری دو گونه جلبک پادینا و سارگاسوم به دو روش ماسیراسیون و اولتراسوند به همراه آنالیز ترکیبات آن‌ها و بررسی اثر آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و خواص آنزیمی عصاره‌ها بوده است. نتایج حاکی از آن است که بازده عصاره‌گیری جلبک سارگاسوم به روش ماسیراسیون از باقی عصاره‌ها بالاتر بوده است (۳/۰۹ g/100g) و عصاره اولتراسوندی این جلبک خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بالاتری داشته است. مهار آنزیم استیل کولین استراز و میزان فعالیت آنزیم نیتریک اکساید در عصاره اولتراسوندی پادینا در بالاترین مقدار بود.. به طور کلی در همه عصاره‌ها باکتری‌های *Escherichia coli* و *Listeria innocua* از بقیه میکروارگانیسم‌ها مقاوم تر بودند و نتایج آزمون میکروبی نشان داد عصاره اولتراسوند پادینا از باقی عصاره‌ها به طور معناداری خاصیت ضد میکروبی بیشتری داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده روش اولتراسوند روش مناسبی جهت عصاره‌گیری می‌باشد و همچنین از این عصاره می‌توان به عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، ضد آلزایمر و کاهش‌دهنده نیترات در افزودنی‌های غذایی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: جلبک، GC-MS، خواص آنزیمی، عصاره‌گیری، ضد میکروبی

مقدمه

در میان ارگانیسم‌های دریایی، جلبک‌های دریایی منبع غنی ترکیبات متعدد با فعالیت‌های بیولوژیک هستند. این جلبک‌ها منبعی مغذی و غنی از ترکیبات بیواکتیو مثل ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، فیبرهای غذایی، پروتئین‌ها و مواد معدنی هستند. هم چنین بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مثل ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، استرول‌ها، پلی ساکاریدهای سولفات‌دار، پلی فنول‌ها، سارگاکوئینوئیک اسیدها، سارگاکرومنول، فئوفیتین از گونه‌های مختلف جلبک ایزوله شده است. این ترکیبات ایزوله شده فعالیت‌های زیستی گوناگونی مانند فعالیت آنتی اکسیدانی، حفاظت عصب، ضد میکروب، حفاظت از کبد، ضد ویروسی و غیره نشان می‌دهند (Cox *et al*., 2010). کشت جلبک به دلیل مصارف بسیار زیاد در زمینه‌های دارویی و غذایی از اهمیت بسیاری برخوردار است. وجود سواحل گسترده در ایران امکان کاشت انواع جلبک‌های دریایی موجود در این اکوسیستم را فراهم می آورد. سواحل جنوب کشور ایران به خصوص سواحل غنی استان سیستان و بلوچستان به طول حدود ۳۰۰ کیلومتر یکی از مهم‌ترین مناطق کشت

۱، ۲ ، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران و استاد گروه صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: shilla2462462@yahoo.co.in)
۴- استاد دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
DOI: 10.22067/ifstrj.2021.73113.1104

و پرورش جلبک‌ها می‌باشد. تاکنون بیش از ۱۸۰ گونه از جلبک‌ها در سواحل استان سیستان و بلوچستان شناسایی گردیده است که قسمت اعظم آن دار ای ارزش اقتصادی و تجاری بالا و تعداد ی نیز خوراکی بوده و به مصرف انسان، دام، طیور و آبزیان می‌رسد و بعضی از گونه ها نیز پرورشی می‌باشند (Latifi *et al*., 2015). جلبک سارگاسوم دارای گونه‌های متعددی است که حاوی پلی‌ساکاریدهای قندی با پایه سوکروز هستند و می‌توانند فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از خود بروز دهند. سارگاسوم دارای شاخه‌های منشعب و انبوه استوانه‌ای شکل است. که از یک محور به تمامی جهات گسترده شده است. شاخه‌های این جلبک به وسیله برآمدگی‌هایی شبیه برگ احاطه گردیده که باعث شناور شدن این جلبک در آب می‌شوند. گونه‌های سارگاسوم جلبک‌های قهوه‌ای (علف دریایی) حاره‌ای و زیرحاره‌ای دریایی کم عمق هستند (Duarte *et al*., 2001). این جلبک متابولیت‌های ساختاری مثل مروترپنوئیدها، پلی کوئینون‌ها، استروئیدها، سارگاکوئینوتیک اسیدها، سارگاکرومنول، پلاستوکوئینون-ها، استروئیدها، گلیسیریدها و غیره را تولید می‌کنند که می‌توانند فعالیت‌های درمانی داشته باشند (Yende *et al*., 2014). پادینا، جلبک دریایی قهوه‌ای متعلق به خانواده Dictyotaceae است که به طور گسترده در سراسر آب‌های گرمسیری وجود دارد و معمولا در امتداد صخره‌های مرجانی قرار دارند. تاکنون حدود ۸۰ گونه ازجنس پادینا در دنیا شناسایی شده است. محل زیست این جلبک دریایی در نواحی جزر و مدی عمق ۱۰-۰ متری آب‌های گرم گزارش شده وبه دلیل شکل خاص ، اندازه و رنگ بخصوص برگ‌های آن به‌راحتی از سایر جلبک‌های دریایی قابل شناسایی است. در سواحل شمالی خلیج فارس ۶ گونه از جنس پادینا از جمله *Padina borergesenii* شناسایی شده است. این جلبک جزء فراوان‌ترین جلبک‌های سواحل شمالی دریای عمان و خلیج فارس می‌باشند (Amini *et al*., 2013؛ Rohani-Ghadikolaei *et al*., 2012). داوی و همکاران (Devi *et al*., 2014) به بررسی خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی جلبک *S. wightii* پرداختند. عصاره گیری با استفاده از ۳ حلال استون، اتانول و متانول انجام گرفت. عصاره استخراج شده با استون بیشترین فعالیت ضد میکروبی را علیه ۸ پاتوژن نشان داد. همچنین نتایج GC-MS نشان داد دو ترکیب عمده ۲۴-متلین کلسترول و متیل اولئات در عصاره استخراج شده وجود دارند و دارای بیشترین فعالیت فنولی و فلاونوئیدی بودند. کردجازی و همکاران (Kordjazi *et al*., 2019) ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی دو گونه از جلبک سارگاسوم جزیره قشم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این جلبک‌های دریایی دارای سطح قابل قبولی از مواد معدنی و پروتئین هستند. همچنین اسید پالمیتیک، اسید چرب غالب در پروفایل اسیدهای چرب گزارش شد. فعالیت ضد باکتریایی با استفاده از روش انتشار دیسک علیه *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* (باکتری‌های گرم مثبت) و *Escherichia coli* و *Salmonella enteritidis* (باکتری‌های گرم منفی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این محققین نشان داد عصاره این ترکیبات هیچ فعالیت ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های گرم منفی نداشتند. تنها در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر هاله کوچکی علیه *B. subtilis* و *S. aureus* مشاهده گردید(Kordjazi *et al*. 2019)).

هیلا و همکاران (Hlila *et al*., 2017) به بررسی خصوصیات مختلف عصاره جلبک پادینا به دست آمده از ساحل مدیترانه کشور تونس پرداختند و گزارش کردند این جلبک دارای محتوای بالایی از ترکیبات فنولی و ضد میکروبی است. *Padina australis* دارای مقدار قابل توجهی از پلی‌فنل‌ها با خواص آنتی اکسیدانی و ضد AChE (استیل کولین استراز) می باشد که می توان آنها را در درمان اختلالات نوروژنیک تاثیرگذار باشند (Hlila *et al*., 2017)). همبستگی مثبت قوی بین کل فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی قسمت ها یافت شده است که قسمت کریستال های قطبی دارای فعالیت مهار کننده AChE و آنتی اکسیدانی بالاتر هستند (Franco *et al*. 2008). استیل کولین (Ach) یک انتقال دهنده عصبی تحریک کننده است که در اتصالات عصبی عضلانی و سیناپس گانگلیونی (ganglionic) یافت می شود که توسط آنزیم هیدرولیز کننده استیل کولین استراز (AChE) به استات و کولین هیدرولیز شده است. هیدرولیز ACh توسط AChE موجب خاتمه انتقال عصبی کولینرژیک می شود. بنابراین، مهار AChE ممکن است به میزان قابل توجهی باعث بهبود سطح ACh کاهش یافته در بیماران آلزایمر می شود. در حال حاضرسازمان غذا و دارو، پنج دارو برای استفاده درمانی را تأیید کرده است که ممکن است وضعیت بیمار AD را بهبود بخشد. افق درمان آلزایمر هرگز روشن تر نبوده است. با توجه به مشکلات زیستی و برخی از عوارض جانبی داروها مانند اختلالات دستگاه گوارش و سمیت کبد، هنوز هم علاقه زیادی به پیدا کردن مهار کننده های ChE بهتر از منابع طبیعی وجود دارد (Uysal *et al*. 2017).

هدف از این تحقیق بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات مختلف ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره استخراج شده ۲ نوع جلبک سارگاسوم و پادینا به دست آمده از استان سیستان و بلوچستان می‌باشد. با توجه به ضرورت به کار گیری ترکیبات طبیعی زیست فعال در محصولات دارویی و غذایی، اهمیت پروژه مشخص می گردد. همچنین قابلیت استفاده از جلبک های مورد پژوهش با توجه به پسماند بالای آن ها و آلودگی‌های زیست محیطی توجیه قابل قبولی خواهد داشت.

مواد و روش‌ها

تهیه جلبک و عصاره‌گیری

جلبک‌های قهوه‌ای پادینا و سارگاسوم از استان سیستان و بلوچستان (بندر چابهار) جمع آوری شد. جلبک‌ها به قطعات ریز تبدیل شده وسپس تحت فرایند عصاره گیری با دو روش ماسیراسیون و اولتراسونیک قرار گرفتند.

عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون

در این روش ۱۰ گرم از جلبک با ۵۰ میلی‌لیتر حلال‌های متانول، ان–هگزان و ان–بوتانول مخلوط شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در محیط قرار داده شد. روز بعد فاز آلی جدا و مجددا حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مخلوط حلال آلی توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان حذف گردید (Vieitez *et al.*, 2018).

عصاره‌گیری روش اولتراسونیک

در این روش، از امواج غیر مستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۷۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم جلبک به همراه حلال متانول، ان–هگزان و ان–بوتانول در بشر قرار داده شد. مخلوط به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول و حلال‌های دیگر به دست آمده توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان حذف گردید (Pezeshkpour *et al.*, 2018).

تعیین ترکیبات شیمیایی با استفاده از دستگاه GC-MS

عصاره اتانولی پس از تغلیظ و آماده‌سازی با روش زیر، جهت شناسایی ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار گرفت. عصاره به مدت ۴۸ ساعت در دمای فریزر قرارداده شد تا ترکیبات موم و چربی آن جدا شود. سپس عصاره اتانولی در همان دما با استفاده از کاغذ صافی جدا شد. عصاره اتانولی با میزان برابری از هگزان مخلوط شده و در یک ارلن ریخته شد. ۱ ساعت مخلوط حاصل بر روی شیکر با دور ۱۸۰rpm قرار داده شد تا یکنواخت و همزده شود. آن را در یک جداکننده ریخته و ۲۰ دقیقه دردمای محیط و به صورت ثابت قرار داده شد تا دوفاز گردد. در نهایت فاز هگزانی جهت تزریق به GC/MS مورد استفاده قرار گرفت (Hameed *et al.*, 2015).

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

تعیین محتوای کلی پلی‌فنول

نمونه ها با آب مقطر استریل شسته و در سایه خشک شدند. سپس به قطعات کوچک برش داده و در یک میکسر آسیاب پودر شد. آن‌ها در کیسه‌های پلی اتیلن یا ظرف هوادهی در دمای اتاق ذخیره شدند. ۱۰۰ گرم نمونه (پودر) به مدت ۶ ساعت با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول (۲: ۱) در یک استخراج سوکسله (SOX406/Hanon) استخراج شدند. استخراج سه بار تکرار شد. عصاره های کل فیلتر شده و فیبرها به دست آمده (عصاره های خام) تحت فشار کاهش یافته به خشکی متمرکز شدند. این عصاره های متمرکز به عنوان پلی‌فنول دریایی خام برای تجزیه و تحلیل بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر نمونه خام با ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. جذب تمام محلول های نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج۷۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. اسید گالیک به عنوان یک استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و منحنی کالیبراسیون در غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد. محتوای فنل برحسب گرم گالیک اسید در یک کیلوگرم گزارش شد (Papandreou *et al.*, 2009).

تعیین محتوای کل فلاوونویید

محتوای کل فلاونوئید هر عصاره با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم توصیف شده توسط چانگ و همکاران با تغییرات جزئی تعیین شد. به طور خلاصه، نمونه عصاره تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با متانول رقیق شد. منحنی کالیبراسیون با رقت‌سازی کوئرستین در متانول تهیه شد (۱۰۰–۰ میکروگرم در میلی لیتر). عصاره رقیق شده یا کوئرستین (۲ میلی‌لیتر) با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول استات پتاسیم ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس حداکثر جذب مخلوط با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای کل فلاونوئید به صورت گرم کوئستین در هر کیلوگرم عصاره جلبک بدون چربی بیان شد (Chang *et al.*, 2002).

روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد

در این روش، رادیکال چربی دوست DPPH با آنتی‌اکسیدان‌هایی که دهنده هیدروژن هستند، واکنش داده و رنگ محلول به زرد روشن تبدیل شده و میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد. نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید (Brand-Williams *et al.*, 1995).

ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های جلبک

برای این آزمون از باکتری‌های شاخص *S. aureus* ATCC25923، *Listeria innocua* ATCC 33090، *E. coli* ATCC 25922 و *S. typhi* ATCC 6539 استفاده گردید.

انتشار چاهک در آگار

در روش چاهک در آگار برای بررسی اثرعصاره جلبک غلظت‌های ۳/۱۷۵ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از سویه‌های پاتوژن را درمحیط کشت مولر هینتون آگار ریخته و کشت انجام گردید. در مرحله بعدی و با استفاده از پیپت پاستور استریل ۵ چاهک با قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد گردید. جهت جلوگیری از نفوذ عصاره به کف پلیت، انتهای چاهک‌ها توسط آگار مذاب مسدود شد. داخل ۴ عدد از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های تهیه شده از عصاره ریخته شد و چاهک پنجم نیز به عنوان شاهد استفاده شد. پس از گرم خانه گذاری محیط کشت به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، هاله بازدارندگی یا عدم رشد در محیط اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌متر گزارش شد (Behbahani *et al*., 2018).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC)

ابتدا یک محلول مادر از عصاره با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. برای این منظور ۵/۱۲ گرم از عصاره با ۹/۵ میلی‌لیتر محیط کشت‌های مولر هینتون براث و ۰/۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید مخلوط گردید و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون استریل شد. ۵ میلی لیتر از این محلول با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، درون یک شیشه استریل مخلوط گردید و به این ترتیب ادامه داده تا غلظت‌ها نصف گردند و غلظت های متوالی ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. در این روش از پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده گردید. به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده و در نهایت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل ۰/۵ مک فارلند) اضافه شد. از چاهک‌های حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت و خانه‌های حاوی عصاره و محیط کشت به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به هر چاهک افزوده و پلیت به مدت نیم ساعت انکوبه گردید. در چاهک‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌گردد. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد گزارش گردید (Noshad *et al*., 2018).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

با توجه به نتایج آزمون قبل، از چاهک‌هایی که فاقد رنگ قرمز بودند، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس محیط‌های کشت گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد میکروارگانیسم بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شدند (Ferrazzano *et al*., 2017).

تعیین فعالیت آنزیمی

در این مطالعه فعالیت استیل کولین استراز با استفاده از روش معرفی شده توسط المن و همکاران (Ellman *et al*., 1961) و همچنین فعالیت نیتریک اکساید بر اساس پروتکل کیت خریداری شده (نوند–ایران) مورد بررسی قرار گرفت.

طرح آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تعیین تفاوت بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد، همچنین برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Mini-Tab17 استفاده گردید.

نتایج و بحث

در حال حاضر تحقیقات زیادی به منظور بررسی و شناسایی محصولات طبیعی انجام شده است که می‌تواند جهت بهبود شرایط برخی از بیماری‌ها به کار گرفته شود. توسعه و تبیین مواد تشکیل‌دهنده مکمل‌های غذایی دارویی یک موضوع داغ در صنایع غذایی می‌باشد. در جستجو غذاهای دارویی ، توجه بیشتری به منابع دریایی شده است. در میان ارگانیسم‌های دریایی، جلبک‌های دریایی منبع غنی ترکیبات با ساختار گوناگون و بیواکتیو با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف هستند. این جلبک‌ها منبعی مغذی و غنی از ترکیبات بیواکتیو مثل ویتامین‌ها، کاروتنوئید، فیبرهای غذایی، پروتئین‌ها و مواد معدنی هستند. هم چنین بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مثل ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، استرول‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفات دار، پلی فنول‌ها، سارگاکوئینوئیک اسیدها، سارگاکرومنول، فئوفیتین از گونه‌های جلبک ها ایزوله شده است. این ترکیبات ایزوله شده فعالیت‌های زیستی گوناگونی نشان می‌دهند مثل آنتی اکسیدان،

حفاظت عصب، ضد میکروب، حفاظت از کبد، ضد فعالیت ویروسی و غیره، بنابرین گونه‌های جلبک ها، پتانسیل زیادی برای استفاده از حوزه‌های داروسازی و غذا دارو دارند (Mekinić *et al*., 2019).

عصاره‌گیری

جلبک‌های دریایی به طور گسترده در سراسر آب‌های دریای گرمسیری توزیع شده و معمولا در ناحیه بی‌نهایت یا در امتداد صخره‌های مرجانی قرار دارد. تاکنون حدود ۸۰ گونه از جنس پادینا و سارگاسوم در سطح دنیا شناسایی شده است. بازده عصاره‌گیری جلبک سارگاسوم به روش ماسیراسیون ۳/۰۹ گرم بر ۱۰۰ گرم و بازده این عصاره به روش اولتراسوند ۱/۶۸، جلبک پادینا به روش ماسیراسیون ۰/۹۲ و روش اولتراسوند ۰/۷۴ گرم بر ۱۰۰ گرم بود. فوجی و همکاران (Fujii *et al*., 2004) به منظور عصاره‌گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده کردند. از اهداف این مطالعه بررسی تاثیر عوامل مختلف در روش اولتراسونیک بر روی کیفیت عصاره‌های حاصل از این روش بود .متغیرها شامل حلال (متانول و اتانول) و زمان عصاره‌گیری ۵ و۱۰ دقیقه بود. تایج نشان داد که نوع حلال نسبت به زمان عصاره‌گیری تاثیر بارزتری روی بازده عصاره‌گیری دارد (Fujii *et al*., 2004). همچنین نتایج نشان داد عصاره اتانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد. در روش اولتراسوند امواج صوتی که فرکانس‌های بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز دارند، نوسان‌های مکانیکی در یک ماده ایجاد می‌کنند. در حالت انبساط، حباب‌هایی دریک مایع ایجاد می‌شود و فشار منفی تولید می‌کند. حباب‌های تشکیل شده، رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. دو حالت کلی استخراج ، حمام‌های اولتراسوند و سیستم پروب اولتراسوند می‌باشند. تأثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ بیشتری از حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهند (Chemat *et al*., 2017). اولتراسوند طی استخراج می‌تواند دیواره‌های سلولی را نیز تخریب کند و باعث تسهیل آزادسازی محتوای آن شود. بنابراین، تخریب سلولی کارآمد و انتقال جرم مؤثر، دو فاکتور اصلی هستند که باعث افز ایش استخراج با اولتراسوند می‌شود. فرکانس اولتراسوند تأثیرات زیادی روی بازده و سرعت استخراج دارد. همچنین اثرات اولتراسوند روی بازده و سرعت استخراج اولتراسوند بسته به ماهیت مواد گیاهی استخراجی متفاوت می باشد. استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و جایگزین مناسبی بر ای روش‌های سنتی استخراج است. فواید اصلی استفاده از اولتراسوند در استخراج شامل افزایش بازده استخراج و سرعت استخراج است. اولتراسوند امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد. در مقایسه با تکنیک‌های استخراج جدید دیگر هم چون استخراج با مایکروویو، دستگاه اولتراسوند ارزان‌تر است و اجرای آن راحت‌تر می‌باشد. استخراج به کمک اولتراسوند مشابه استخراج با سوکسله می‌تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود (Wen *et al*., 2018).

تعیین ترکیبات شیمیایی با استفاده از دستگاه GC-MS

بیشترین ترکیبات موجود در عصاره هر دو جلبک Butanoic acid,butul ester و n-Hexadecanoic acid بوده است. درصد ترکیبات عمده در عصاره جلبک پادینا به روش ماسیراسیون و اولتراسوند در جدول ۱ آمده است:

در عصاره جلبک‌ها درمجموع ۱۵ ترکیب شناسایی شد که ۱۰۰ درصد کل عصاره استخراجی را تشکیل می‌داد. با مقایسه نتایج ترکیبات شناسایی شده (شکل ۱) با مطالعات پیشین، هرچند اجزای اصلی عصاره‌ها تا حدودی مشابه با یافته‌های سایر محققین بود، اما تفاوت‌هایی بویژه در غلظت ترکیبات وجود داشت.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی عصاره پادینا (ماسیراسیون)

Table 1- The chemical compounds of Padina extract (maceration)

	ترکیبات Compounds	زمان بازدارندگی Retention time	درصد (%)
1	4- Heptanol	8.3	2.82
2	4- Heptanone,3-methyl	9.022	1.17
3	Butanoic acid,butul ester	10.80	9.45
4	3-Deoxy-d-mannitol	11.65	1.6
5	Butane,1,1-dibutoxy	18.05	36.12
6	Tetradecanoic acid	30.15	5.11
7	Palmitoleic acid	32.52	3.95
8	n-Hexadecanoic acid	32.82	27.16
9	Cis-13-Octadecanoic acid	34.27	9.29
10	Phytol	34.64	3.34

جدول ۲- درصد برخی ترکیبات شیمیایی عصاره پادینا (اولتراسونیک)

Table 2- The chemical compounds of Padina extract (ultrasonic)

	ترکیبات **Compounds**	زمان بازدارندگی **Retention time**	درصد **(%)**
1	1-Butanol-2-methyl-(S)-	6.219	1.18
2	4- Heptanol	8.382	5.99
3	4- Heptanone,3-methyl	9.091	3.56
4	Butanoic acid,butul ester	10.831	23.58
5	3-Deoxy-d-mannitol	11.666	5.04
6	Silane,dimethylisobutoxybutoxy	13.772	2.59
7	Butane,1,1-dibutoxy	17.994	7.32
8	Tetradecanoic acid	30.074	3.78
9	Hexadecanoic acid,methyl ester	32.191	2.02
10	Palmitoleic acid	32.465	5
11	n-Hexadecanoic acid	32.751	22.97
12	Cis-Vaccenic acid	34.594	8.02
13	Phytol	34.622	4.67
14	Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol(3β,24Z)-	47.46	4.27

جدول ۳- درصد برخی ترکیبات شیمیایی عصاره سارگاسوم (ماسیراسیون)

Table 3- The chemical compounds of Sargassum extract (maceration)

	ترکیبات **Compounds**	زمان بازدارندگی **Retention time**	درصد **(%)**
1	1-Butanol-2-methyl-(S)-	6.301	2.71
2	4- Heptanol	8.424	8.45
3	4- Heptanone,3-methyl	9.128	3.06
4	Butanoic acid,butul ester	10.85	32.43
5	Silane,dimethylisobutoxybutoxy	13.78	2.48
6	Butane,1,1-dibutoxy	18.008	20.1
7	Palmitoleic acid	32.451	1.62
8	n-Hexadecanoic acid	32.70	13.81
9	Cis-Vaccenic acid	34.579	7.98
10	Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol(3β,24Z)-	47.471	7.36

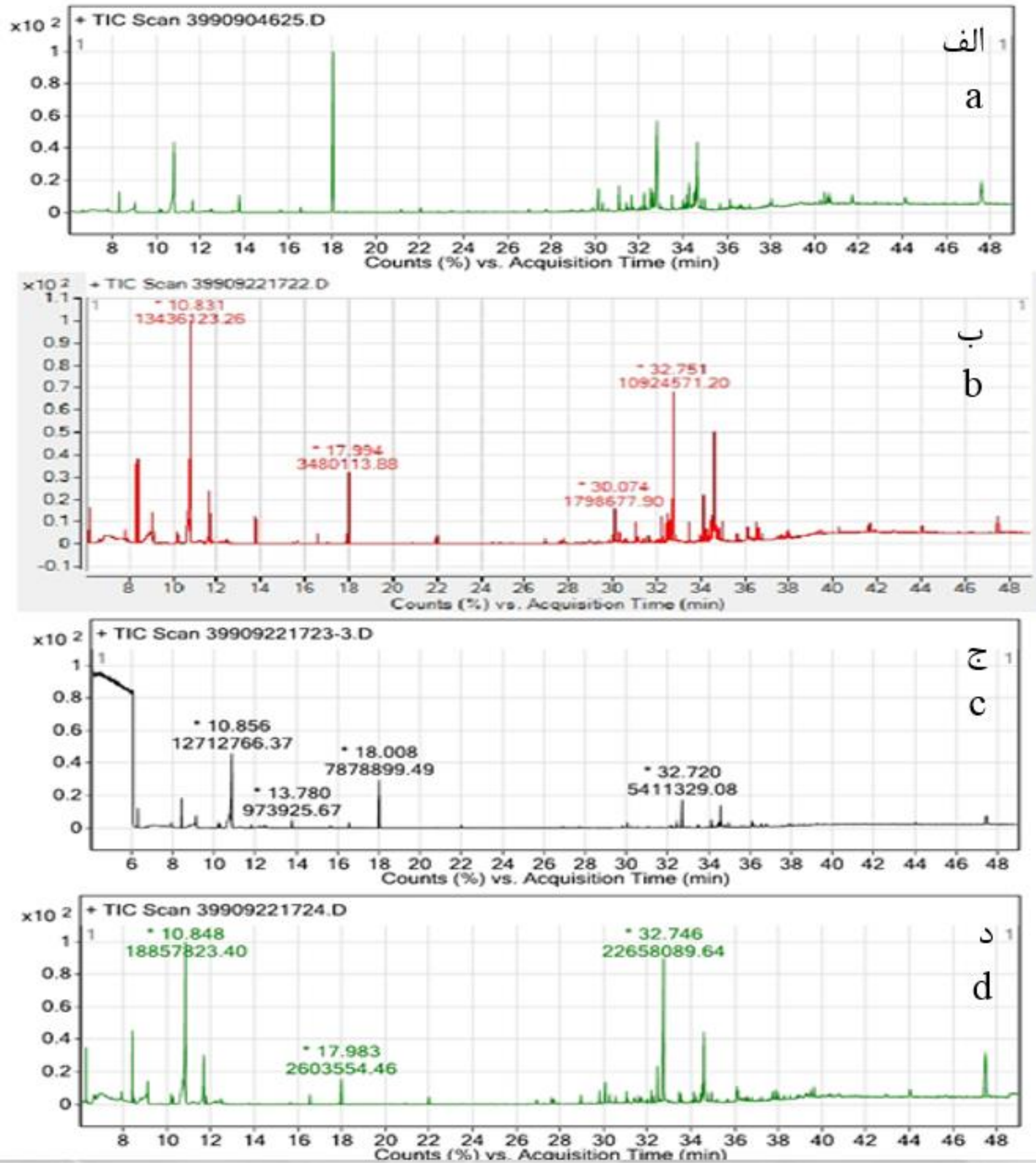
جدول ٤- درصد برخی ترکیبات شیمیایی عصاره سارگاسوم (اولتراسونیک)

Table 4- The chemical compounds of Sargassum extract (ultrasonic)

	ترکیبات **Compounds**	زمان بازدارندگی **Retention time**	درصد **(%)**
1	1-Butanol-2-methyl-(S)-	6.21993	2.65
2	4- Heptanol	8.424	6.65
3	4- Heptanone,3-methyl	9.120	1.85
4	Butanoic acid,butul ester	10.848	23.13
5	Dodecane	16.547	0.94
6	Butane,1,1-dibutoxy	17.983	3.19
7	Tetradecane	21.994	1.09
8	Acetic acid(2,4-dichlorophenoxy)-ethyl ester	28.958	1.01
9	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one	29.816	1.43
10	Tetradecanoic acid	30.073	3.16
11	Neophytadiene	31.046	1.01
12	Palmitoleic acid	32.465	4.55
13	n-Hexadecanoic acid	32.746	27.79
14	Cis-Vaccenic acid	34.588	6.92
15	Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol(3β,24Z)-	47.48	14.63

عبدالله و همکاران (Abdel-Aal *et al.*, 2015) ترکیبات شیمیایی نوعی جلبک قهوه‌ای را مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این محققین نشان داد که -1-Butanol-2-methyl-(S) و -Butane,1,1 dibutoxy، به ترتیب با ۳۸/۵۳ و ۱۴/۲۴ درصد ترکیبات اصلی عصاره می‌باشند. در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده عصاره جلبک قرمز به ترتیب عبارتند بودند از:

Cis-Vaccenic acid (۳۵/۸۳ درصد) و 4- Heptanol (۱۰/۶۷ درصد). تفاوت در میزان ترکیبات اصلی عصاره‌ها می‌تواند ناشی از مناطق جغرافیایی، واریته‌های کشت شده، مرحله برداشت گیاه، روش‌های استخراج و شرایط آنالیز مختلف باشد. یکی از مهمترین عوامل تفاوت در درصدهای ترکیبات شناسایی شده مربوط به روش استخراج عصاره و حلال‌های مورد استفاده می‌باشد (Abdel-Aal *et al.*, 2015). ترکیبات شناسایی شده گروه‌های مهمی از پلی‌ساکاریدهای سولفات شده است که از جلبک‌های دریایی پادینا معمولا جدا می‌شوند. ساختارهای انتخابی این ترکیبات بر اساس گونه‌ها متفاوت است، و ساختار و قابلیت زیستی هنوز نامشخص است. تحقیقات نشان می‌دهد بوتیل‌ها دارای خواص ضد التهابی، ضد انعقاد، آنتی‌اکسیدان، و خواص ضد ویروس می‌باشند (Wen *et al.*, 2018).



شکل ۱- کروماتوگرام ترکیبات شیمیایی (GC-MS) مربوط به عصاره جلبک پادینا ماسیراسیون (الف) اولتراسوند (ب) و عصاره جلبک سارگاسوم ماسیراسیون (ج) اولتراسوند (د)

Fig. 1- Chromatogram of chemical compounds (GC-MS) of maceration (a) and ultrasonic (b) Padina extract and maceration (c) and ultrasonic (d) Sargassum extract

در پژوهش سارپال و کاستا (Sarpal and Costa, 2016) ترکیبات موجود در اسانس گیاهان دریایی ناشی از تفاوت‌های اکولوژیکی مانند طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم و خاک، مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز مواد مؤثره در این گیاهان شناسایی شد که در نتیجه متابولیک‌های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی متفاوت، بیوسنتز می‌شود (Sarpal and Costa, 2016). پاتیل و همکاران (Patil *et al*., 2018) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک دریایی قهوه‌ای سارگاسوم پرداختند. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی که از عصاره سارگاسوم گونه سیلیکوآستروم با استفاده از مهار سلول‌های قرمز خون (RBC) همولیز ناشی از رادیکال دی هیدروکلراید آمینو پروپان AAPH، سرکوب پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از هموژن مغز موش صحرایی و فعالیت رادیکالهای سوپراکسید مشخص شد. قسمت دی کلرومتان جدا شده از عصاره خام متانول با استفاده از استخراج حلال‌ها، قوی‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در هر دو آزمایش همولیز RBC و پراکسیداسیون لیپید نشان داد. این قسمت به وسیله کروماتوگرافی ستون سیلیکاژل در مواجهه با RBC در برابر رادیکال های AAPH و در مهار پراکسیداسیون لیپید موثرتر بود. بر اساس کروماتوگرافی نازک و UV وتجزیه و تحلیل طیف‌های IR، تمام زیر فرکانس‌ها شامل ترکیبات فنلی است. با این حال، بین قدرت قوی آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی بالا تخمین زده می‌شود، ارتباط مستقیم وجود دارد (Patil *et al*., 2018). آلوا و همکاران (Avula *et al*., 2017) به بررسی فعالیت بازدارندگی کولین‌استراز دو مشتق فارنسیلاستون حاصل از جلبک قهوه‌ای *Sargassum sagamianum* پرداختند. نتایج نشان دادند که ترکیب یک (5E, 10Z)-6,10,14-trimethylpentadeca-5,10-dien-2,12-dione و ترکیب دو (5E,9E, 13E)-6,10,4-trimethylpentadeca 5,9,13-trien-2,12-dione هر دو ترکیب فعالیت بازدارندگی متوسط استیل کولین‌استراز و آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان دادند (Avula *et al*., 2017).

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

عصاره جلبک پادینا به روش ماسیراسیون و اولتراسونیک به ترتیب دارای IC_{50} برابر با ۳۰۷/۷۲ و ۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره جلبک سارگاسوم به روش ماسیراسیون و اولتراسونیک به ترتیب دارای IC_{50} برابر با ۳۷۶/۹۹ و ۴۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH بودند. روش DPPH قابلیت عصاره در اهدای هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH که سبب زوال رنگ محلول DPPH می‌شود را اندازه‌گیری می‌کند و قدرت رنگبری بالاتر بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد.

فنول کل عصاره ماسیراسیونی و اولتراسوندی جلبک پادینا به ترتیب ۴۰۵۵ و ۴۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (برحسب اسید گالیک) و فنول کل عصاره ماسیراسیونی و اولتراسوندی جلبک سارگاسوم برابر با ۳۳۹۷ و ۴۶۶۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم (برحسب اسید گالیک) بود. محتوای فلاوونوئید کل عصاره ماسیراسیونی و اولتراسوندی جلبک پادینا به ترتیب ۲۴۵۹ و ۴۵۶۹ میکروگرم بر گرم (برحسب کوئرستین) فلاوونوئید کل عصاره ماسیراسیونی و اولتراسوندی جلبک سارگاسوم به ترتیب ۱۶۳۰ و ۵۵۳۹/۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم (برحسب کوئرسیتین) بدست آمد.

استرس اکسیداسیونی ناشی از عدم توازن بین هموستازی پرواکسید و آنتی‌اکسیدان است که منجر به تولید گونه‌های اکسیژن راکتیو سمی (ROS) می‌شود. ROS مثل رادیکال‌های هیدروکسیل، سوپراکسید، و پروکسیل در سلول‌های بافت انسان تشکیل می‌شود که به ماکرومولکول‌هایی مثل لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و DNA حمله می‌کنند و منجر به اختلالات سلامتی زیادی مثل سرطان، دیابت، شرایط تحلیل مربوط به سن، تحلیل عصبی، و بیماری‌های التهابی می‌شوند که به بافت‌های آسیب شدیدی وارد می‌کند (Moein *et al*., 2015). آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است تاثیر مثبت بر سلامت انسان داشته باشند زیرا می‌توانند از بدن انسان در برابر آسیب ROS حفاظت کنند. در بدن سلول‌ها سیستم دفاعی ذاتی آنتی‌اکسیدانی خود را به شکل مسیرهای مختلف آنزیمی و غیرآنزیمی برای رفع ROS دارند. در میان مسیرهای آنزیمی، O_2 با دیسموتاز سوپراکسید (SOD) به H_2O_2، رداکتاز کاتالاز (CAT) H_2O_2 به آب و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌شود. پروکسیداز گلوتاسیون (GPX) کاهش H_2O_2 به آب و پروکسید آلی به الکل را به بهای گلوتاسیون تقلیل یافته (GSH) کاهش می‌دهد، در حالیکه گلوتاسیون – S– ترانسفراز بیگانه‌زی‌ها (مواد مضر) را برای رفع با گلوتاسیون هم یوغ می‌کند. در میان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، جلبک‌های دریایی منبع غنی آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شوند. فعالیت‌های آنتی اکسیدانی گونه های سارگاسوم با روش‌های مختلف تایید شده است، مثل پاکسازی رادیکال 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)، پاکسازی رادیکال 2,2'-azinobis-3-ethylbenzo thizoline-6-sulfonate (ABTS)، پاکسازی NO، بازداری پروکسید لیپید، ارزیابی پاکسازی رادیکال سوپراکسید و هیدروکسیل (Otero *et al*., 2018).

گیاهان به طور سنتی در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون به کار می‌روند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتا به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. ترکیبات فنولی شامل

فنول‌های ساده، با یک حلقه آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است و ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشند. ترکیبات پلی‌فنولی که دارای دو بخش فنولی باشند، فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند. ترکیبات فنولی تقریباً در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی و جوانه‌زنی نقش دارند. از مهم‌ترین خصوصیاتی که به این گروه نسبت داده می‌شود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده که به آن‌ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد. علاوه بر این پلی‌فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله: فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدالتهاب، ضدآلرژی و گشادکننده عروق گزارش شده است (Kordjazi *et al.*, 2019).

معرف فولین سیو کالتیو واکنشگری است که به طور گسترده در سنجش ترکیبات فنولی به کار می‌رود. گروه هیدروکسی فنولی با واکنشگر ترکیب شده و بخش رنگ‌سازی را تولید می‌کند که در ۷۶۰ نانومتر تعیین مقدار می‌گردد. روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها وابسته به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره‌گیری و مخصوصا قطبیت آن است. علاوه بر این‌ها استخراج ترکیبات فنولی از سایر ترکیبات بیولوژیک گیاه، به وسیله روش‌های استخراج قدیمی در واقع هدر دادن حلال و زمان است. تکنیک‌های پیشرفته استخراج مانند عصاره‌گیری به کمک امواج مایکروویو و یا اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر دشواری‌های روش قدیمی شده است. در این زمینه استفاده از امواج اولتراسوند جهت شکستن غشا سلولی باعث کاهش زمان عصاره‌گیری و افزایش بازده شده است (Boi, Cuong, and Khanh Vinh 2016).

مارک و آنیک (Gaysinski Marc and Ortalo-Magné Annick, 2015) گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای سولفات‌دار Sargassum fulvellum در پاکسازی NO و پاکسازی DPPH قویتر از آنتی اکسیدان‌های تجاری مثل آلفا توکوفرول هستند (Gaysinski Marc and Ortalo-Magné Annick 2015). معین و همکاران (Moein *et al.*, 2015) به بررسی مقایسه اهمیت روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه مورد *Myrtus communis* پرداختند. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه این گیاه طراحی شده است. نتایج به وضوح نشان داد که استفاده از روش استخراج، تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. در مورد این گیاه، روش عصاره‌گیری با سوکسله و ماسیراسیون مناسب‌تر از اولتراسونیک تعیین شد. بالاترین راندمان عصاره‌گیری مربوط به سوکسله بود. این عصاره بالاترین میزان فنلی تام و فلاونوئید تام را نیز دارا بود (P<۰/ ۰۰۱). در به دام اندازی رادیکال DPPH عصاره حاصل از روش سوکسله (IC50=11/3 ± 0/3 μg/ml) اختلاف معنی‌داری با عصاره‌های حاصل از دو روش دیگر داشت (P < ۰/۰۵). هر سه عصاره قوی‌تر از BHA بودند (P < ۰/ ۰۰۱) (Moein *et al.*, 2015). ماچو و همکاران (Machu *et al.*, 2015) به بررسی فعالیت ضد رادیکال و حفاظت عصبی عصاره پلی فنلی درون جلبک دریایی *Padina australis* H پرداختند و نتایج نشان دادند که همبستگی مثبت قوی بین کل فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی وجود دارد و *Padina australis* H دارای مقدار قابل توجهی از پلی فنل‌ها با خواص آنتی‌اکسیدان می‌باشد که می تواند به طور امیدوار کننده در درمان اختلالات نوروژنیک موثر باشد (Machu *et al.*, 2015). فرانکو و همکاران (Franco *et al.*, 2008) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان پلی ساکارید سولفات حاوی فوکوز (FCSP) از جلبک دریایی هاوایی پرداختند. این FCSP خام نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. مطالعات جلبک دریایی هاوایی نشان می دهد فعالیت‌های آنتی اکسیدانی بیشتری از سه جلبک قهوه ای، بیش از جلبک‌های دیگر، که پادینا را به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان ایجاد می کند (Franco *et al.*, 2008).

ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های جلبک

نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد به طور کلی در همه عصاره‌ها باکتری‌های *Escherichia coli* و *Listeria innocua* بقیه میکروارگانیسم‌ها مقاوم‌تر بودند و همچنین عصاره اولتراسوند پادینا از باقی عصاره‌ها به طور معناداری خاصیت ضدمیکروبی بیشتری داشته است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اولتراسوندی جلبک پادینا در ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* به‌دست آمد و این باکتری از باقی باکتری‌ها مقاومت کمتری داشته است. عصاره اولتراسوندی جلبک پادینا در ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* اثر باکتری‌کشی داشت. بررسی نتایج آماری داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله آنالیز واریانس به روش چاهک نشان داد بیشترین اثر ضدمیکروبی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر برای عصاره اولتراسوندی جلبک پادینا بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* می‌باشد (جدول ۵ و شکل ۲).

علت تأثیر متفاوت عصاره‌ها بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ممکن است به دلیل تفاوت ساختاری موجود بین دیواره این دو گروه از باکتری‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی واجد غشای خارجی هستند که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب گریز جلوگیری می‌کند. از آنجایی که اکثر ترکیبات مؤثر موجود در اسانس و عصاره‌ها ماهیت آب‌گریزی دارند بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این مواد امکان ورود و دسترسی به نقاط فعال درون باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل معمولا باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با انواع گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به این ترکیبات نشان می‌دهند (Kausalya and Rao, 2015). در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید که بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها بر علیه باکتری‌های گرم مثبت مشاهده می‌شود. به‌گونه‌ای که ترکیبات فعال موجود در این عصاره‌ها بر روی *S. typhi* که واجد غشاء خارجی همراه با پورین‌هایی با منافذ بسیار کوچک است در غلظت‌های پایین هیچگونه اثر باز دارندگی رشد ندارد. با توجه به اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ی عصاره بر روی باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه نمونه‌های گرم مثبت که در ایجاد انواع عفونت‌های مخرب و بیمارستانی نقش دارند، این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک فرآورده گیاهی طبیعی مدنظر قرار گیرد (Silva *et al.*, 2020). مطالعات زیادی پیرامون خواص دارویی و درمانی از جمله اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها صورت گرفته است.

سیلوا و همکاران (Silva *et al.*, 2020) به بررسی فعالیت‌های ضد باکتری جلبک دریایی قهوه‌ای از (*Sargassum wightii*) و (*Turbinaria ornata*) از خلیج منار پرداختند. تحقیقات حاضر ثابت کرده است که پلی‌فنول‌های جلبک دریایی (*T. ornata* و *S. wightii*) دارای فعالیت ضد میکروبی هستند تا نتایج عالی را برای مهار رشد حداکثر باکتری‌های بیماری‌زا انسان به دست آورند. این امر ممکن است به علت پراکندگی فعالیت ضد باکتری توسط حضور برخی از ترکیبات مهار کننده درعصاره های خام باشد (Silva *et al.* 2020). کاسالیا و رائو (Kausalya and Rao, 2015) به بررسی فعالیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان عصاره‌های *Laurencia catarinensis* ،*Laurencia majuscula* ، *Padinna Pavonica* پرداختند و بالاترین فعالیت ضدباکتری بر روی *Klebsiella pneumonia* توسط *Laurencia catarinensis* و *Padina pavonica* به دست آمد. با این حال، *Padinna* pavonica فعالیت ضد باکتری عالی را نسبت به *Streptococcus pyogenes*، Staph. aureus، *Bacillus subtilis, Acinetobacter baumannii*، نشان دادند. با توجه به ترکیبات فعال جدا شده از جلبک‌های سارگاسوم و پادینا، با نتایج حاصل از این مطالعه در راستای اثبات خواص ضدمیکروبی این گیاه همسویی دارد (Kausalya and Rao, 2015). نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ای نشان داد که عصاره متانولی جلبک‌های و سارگاسوم *Padina gymnospora* پادینا گیمنوسپورا اثر متوسطی بر *Sargassum dentifolium* دنتیفولیوم روی باکتری *E. coli* دارند. مطالعات پیشین، اثر ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای را نشان داده‌اند. جلبک‌های قهوه‌ای دارای متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی و دیگر مواد طبیعی هستند که این مواد مسئول خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها می‌باشند. همچنین در تحقیق دیگری نتایج به‌دست آمده از آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که جلبک پادینا گیمنوسپورا نسبت به جلبک سارگاسوم ویتی اثر بیشتری بر روی ویبریوکلرا داشته‌است (Silva *et al.*, 2020). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که جلبک‌های قهوه‌ای سواحل جنوبی ایران، منابع بالقوه از مواد فعال زیستی هستند و می‌توانند برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرند. با این حال مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات فعال زیستی در جلبک‌های دریایی مورد نیاز است.

تعیین فعالیت آنزیمی

با توجه به روند افزایشی شیوع بیماری آلزایمر در بین سالمندان و مؤثر بودن داروهای مهارکننده آنزیم استیل‌کولین‌استراز در بهبود بیماری، یافتن داروهای جدید مهارکننده این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همان طور که در جدول ۶ و ۷ مشخص شده است بیشترین درصد مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز توسط جلبک پادینا و عصاره اولتراسوندی آن می‌باشد.

در تحقیق هلشر و همکاران (Hielscher-Michael *et al.*, 2016) که، با استفاده از ترکیب زیست فعالی در درمان آلزایمر جهت یافتن ترکیبات غیر آلکالوئیدی با منشاء گیاهی و خاصیت مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز انجام شد، مشخص گردید که دو ترکیب کومارینی، سه مشتق داکان استری، دو ترکیب فنلی و نیز یک ترکیب پلی‌استیلنی جدا شده از گیاه دارند. ولی دوزهای مؤثر عصاره‌های گیاهی که حاوی ترکیبات مختلف هستند قابل مقایسه با ترکیبات استاندارد نبود (Hielscher-Michael *et al.*, 2016).

در تعیین نوع مهار، عصاره‌های گیاهی می‌توانند تقریباً رفتار سینتیکی مشابه با ترکیبات دارویی را داشته باشد. مطابق نتایج، عصاره جلبک‌ها به صورت رقابتی باعث مهار می شود و به نظر می‌رسد که ساختار شیمیایی جزء فعال ممکن است شبیه سوبسترای استیل‌کولین‌استراز یا مهارکننده‌هایی رقابتی آن مثل گالانتامین– Km باشد که به جایگاه فعال اتصال می‌یابند و باعث افزایش درصد مهار می‌شوند. در برخی عصاره‌ها مهار ترکیبی (رقابتی– غیررقابتی) باعث

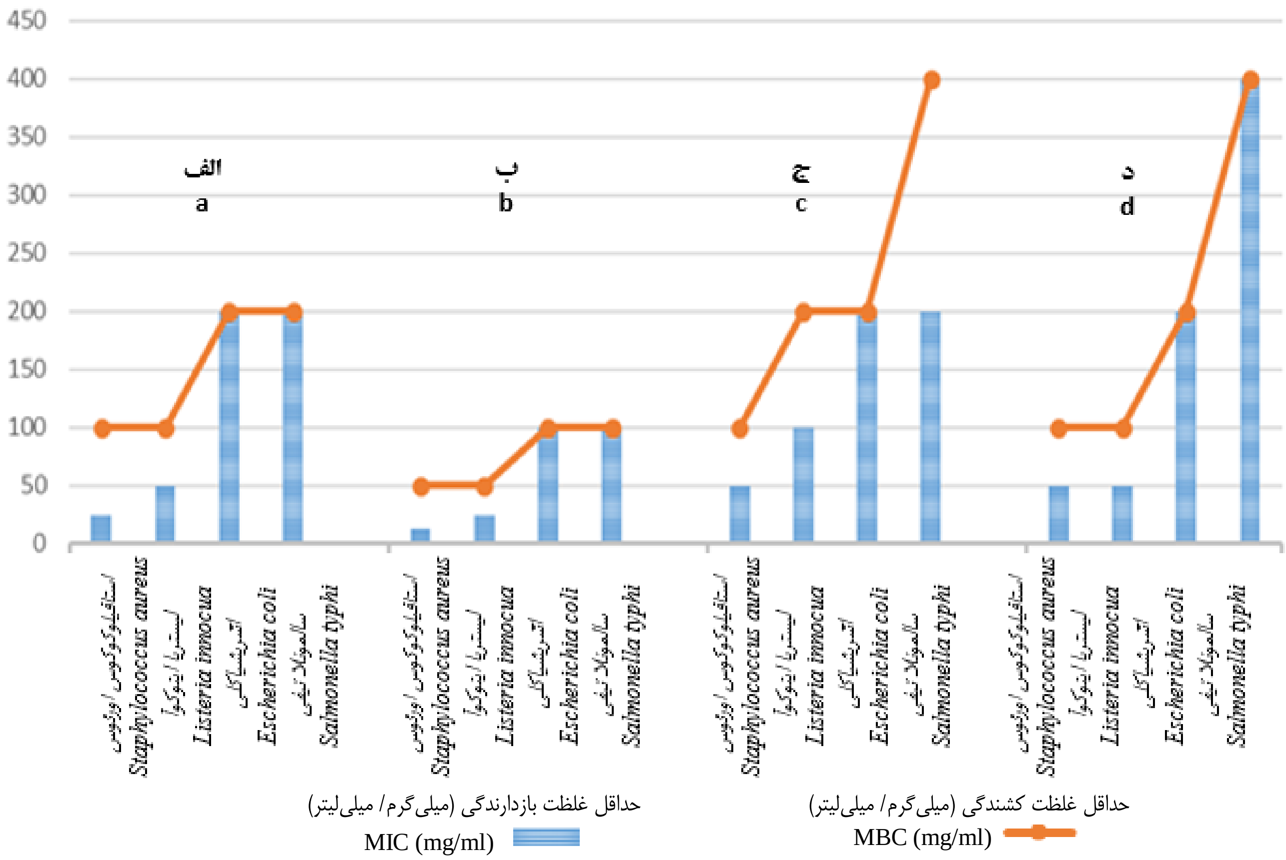
مهار آنزیم شده است، دراین نوع مهار، مهارکننده‌ها می‌تواند به Peripheral anionic site (PAS) جایگاه آنیونی پیرامونی آنزیم متصل و از طریق تغییرات آلوستریکی باعث مهار آنزیم شوند. بنابراین رفتار سینتیکی عصاره‌های فوق می‌توانند در شناسایی اجزای فعال و خالص‌سازی آن‌ها کمک نموده و مبنای مطالعات بعدی باشد (Barbalace *et al.*, 2019).

بیماری آلزایمر (AD) اختلال پیشرونده و تحلیل برنده مغزی است و شایع‌ترین شکل زوال عقل در میان سالمندان است. آلزایمر یکی از بیماری های در حال رشد در ایران و سراسر دنیاست. AD با از بین رفتن سیستم کولینرژیک با کاهش سطح استیل‌کولین در قسمت‌های مغز مرتبط است که به یادگیری، حافظه، عکس‌العمل رفتاری و عاطفی مربوط است.

جدول ٥- میانگین هاله عدم رشد ٤ نمونه عصاره جلبک در برابر پاتوژن‌های غذایی در روش چاهک

Table 5- Mean inhibition zone (mm) of four samples alga extract on pathogenic bacteria (well diffusion agar)

نمونه‌ها Samples	میکروارگانیسم‌ها Microorganisms	غلظت Concentration (mg/ml) 50	100	150	200	کنترل مثبت Control + (کلرامفنیکل) (chloramphenicol)
پادینا-ماسیراسیون Maceration- Padina	استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	12.45±0.63	13.10±0.31	13.20±0.42	14.05±0.12	20
	لیستریا اینوکوآ *Listeria innocua*	11.60±0.43	12.42±0.18	13.00±0.44	15.40±0.37	23
	اشریشیاکلی *Escherichia coli*	9.51±0.03	9.90±0.13	10.10±0.21	11.52±0.23	25
	سالمونلا تیفی *Salmonella typhi*	0	9.30±0.29	10.20±0.36	9.30±0.35	18
پادینا-اولتراسونیک Ultrasonic- Padina	استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	13.36±0.53	16.42±0.17	17.54±0.41	18.30±0.25	20
	لیستریا اینوکوآ *Listeria innocua*	14.46±0.53	15.22±0.32	16.50±0.23	17.00±0.42	23
	اشریشیاکلی *Escherichia coli*	8.60±0.41	8.40±0.15	11.00±0.45	12.23±0.34	25
	سالمونلا تیفی *Salmonella typhi*	7.11±0.01	8.94±0.53	9.00±0.30	11.64±0.24	18
سارگاسوم-ماسیراسیون Maceration- Sargassum	استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	10.51±0.03	9.30±0.30	10.20±0.21	11.30±0.35	20
	لیستریا اینوکوآ *Listeria innocua*	9.16±0.33	10.42±0.17	11.12±0.71	11.30±0.25	23
	اشریشیاکلی *Escherichia coli*	0	0	7.17±0.24	8.00±0.42	18
	سالمونلا تیفی *Salmonella typhi*	7.53±0.25	8.40±0.15	8.06±0.34	8.40±0.42	25
سارگاسوم-اولتراسونیک Ultrasonic- Sargassum	استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus*	10.51±0.13	8.70±0.64	9.01±0.15	10.60±0.22	20
	لیستریا اینوکوآ *Listeria innocua*	9.51±0.02	9.36±0.25	9.46±0.25	10.30±0.35	18
	اشریشیاکلی *Escherichia coli*	7.42±0.51	7.45±0.14	8.30±0.74	9.69±0.36	23
	سالمونلا تیفی *Salmonella typhi*	0	8.20±0.36	8.10±0.22	9.08±0.44	25



شکل ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره جلبک پادینا ماسیراسیون (الف) اولتراسوند (ب) و عصاره جلبک سارگاسوم ماسیراسیون (ج) اولتراسوند (د)

Fig. 2- Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of of maceration (a) and ultrasonic (b) Padina extract and maceration (c) and ultrasonic (d) Sargassum extract

از نظر آسیب‌شناسی عصبی، AD با وجود پلاک‌های بتا آمیلوئید (Aβ)، کلاف رشته‌ای عصبی و تحلیل رفتن نرون‌های کولینرژیک قاعده پیش مغز همراه است بنابراین، نویدبخش‌ترین روش برای درمان نشانه‌ای AD افزایش سطح سیناپسی ACh در مغز با بازداری از آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) است که عامل اصلی هیدرولیز و توقف واکنش است. بنابراین بازدارنده‌های AChE مثل گالانتامین، دونپزیل، ریواستیگمین و تاکارین داروهای اصلی برای مدیریت بالینی AD هستند ACh آزاد شده به دلیل وجود میزان زیادی استیل کولین استراز (AChE) که آنزیمی است که پیوند استر را در مولکلول هیدرولیز می‌کند، نیمه عمر بسیار کوتاهی دارد، در نتیجه فعالیت انگیزشی از بین می‌رود. طی جستجوی ترکیبات آنتی کولین استراز از موجودات دریایی، دو پلاستوکوئینون شناخته شده، اسید سارگاکوینوئیک (۱) و سارگاکرومنول (۲) از *Sargassum sagamianum* جدا شدند. هر دو ترکیب نشان داد فعالیت مهار کننده استیل کولین استراز (AChE) در محدوده میکرومول (IC50 23.2 و32/7 µm به ترتیب) دارند (Barbalace *et al*., 2019).

اولاسهیند و همکاران (Olasehinde *et al*., 2019) گزارش کردند که عصاره متانولیک سارگاسوم بازداری قوی در مقدار IC_{50}، یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در فعالیت کولین‌استراز با استیل کولین یدید (ATCI) و بیوتریل تیول کولین یدید (BTCI) به عنوان سوبسترا نشان داد و دو مشتق فرانسیل استون (تحت عنوان (5E,10Z)-6,10,14-trimethylpentadeca-5,10-dien-2,12-dione و (5E,9E,13E)-6,10,4-trimethylpentadeca-5,9,13-trien-2,12-DIONE) از جلبک قهوه‌ای *کروای Sargassum sagamianum* ایزوله شد و فعالیت بازدارندگی متوسط استیل کولین استراز و بیوتریل کولین استراز را با مقادیر IC_{50} به ترتیب 65.0-48.0 و 34.0-23.0 Mm نشان دادند (Olasehinde *et al*., 2019). راتنایاکا و همکاران (Rathnayake *et al*., 2019) به بررسی

درمان جدید بیماری آلزایمر با توجه به بوتیریل کولین استراز پرداختند و به این نتیجه رسیدند که تنها درمان علائم اثبات شده موثر است، تا به امروز استفاده از مهارکننده‌های کولین استراز (ChE) برای تقویت فعالیت‌های کولینرژیک باقی مانده است. مهارکننده‌های ChE بر روی آنزیم‌هایی که هیدرولیز استیل کولین (ACh) را پس از انتشار سیناپسی عمل می‌کنند، اثر می‌کند. در مغز سالم، استیل کولین استراز (AChE) غالبا ۸۰ درصد و بوتیریل کولین استراز نقش جزئی در تنظیم سطح ACh مغز دارند. در مغز AD، فعالیت بوتیریل کولین استراز افزایش می‌یابد در حالی که فعالیت AChE بدون تغییر یا کاهش می‌یابد. بنابراین هر دو آنزیم‌ها احتمالا در تنظیم سطوح ACh نقش دارند و اهداف درمانی را برای کاهش کولینرژیک کاهش می‌دهند. توسعه مهارکننده‌های بوتیریل کولین استراز و ادامه استفاده از مهارکننده‌های کولین استراز با توانایی مهار بوتیریل کولین استراز علاوه بر استیل کولین استراز منجر به نتایج بالینی بهبود یافته شد (Rathnayake *et al*., 2019). اولاسهیند و همکاران (Olasehinde *et al*., 2019) به بررسی پتانسیل درمانی و مزایای سلامتی گونه‌های سارگاسوم پرداختند. تحقیقات زیادی گزارش شده است که نشان می دهند گونه‌های سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهای سولفاته، پلاستوکوئینون، فلوزانتین، فوکوئیدان، سارگاکوئینوئیک اسید، سارگاکرومنول، استروئیدها، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها و غیره هستند (Olasehinde *et al*., 2017). بعلاوه، این ترکیبات بیواکتیو و عصاره های مختلف پتانسیل درمانی معنی‌داری نشان دادند که می‌توان برای تهیه مواد کاربردی جدید در داروسازی برای درمان یا پیشگیری از اختلالات مختلف بکار برد. بنابراین، تحقیقات بیشتری لازم است تا از حداکثر پتانسیل درمانی آن‌ها در حوزه علوم پزشکی و داروسازی برای کاربری مثمر ثمر جدید بهره‌گیری شود.

در تست قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید، نتایج نشان داد عصاره پادینا حاصل از روش اولتراسونیک دارای بالاترین فعالیت بود (شکل ۳).

جدول ٦- میزان جذب آنزیم استیل کولین استراز و ترکیب آنزیم و عصاره‌های جلبک

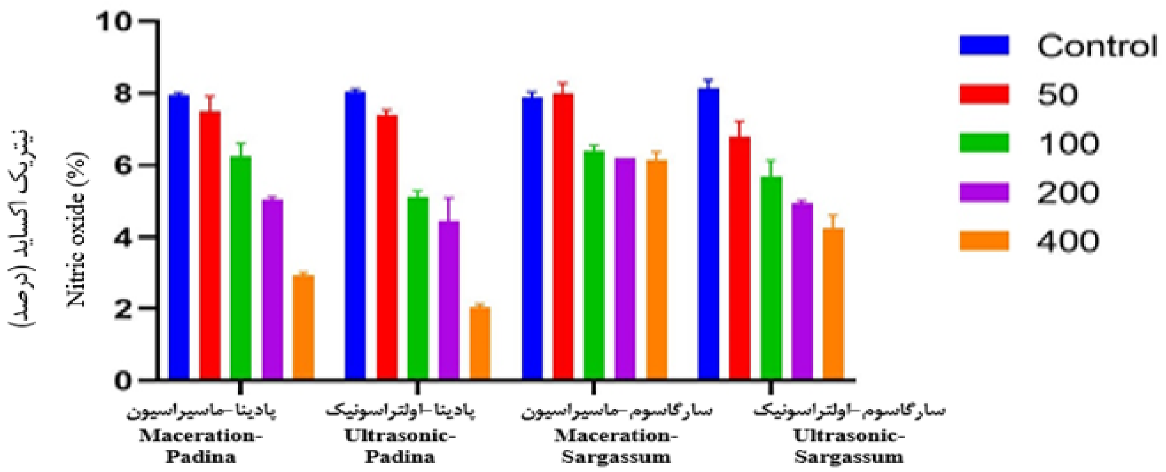
Table 6- The amount of acetylcholinesterase enzyme absorption and the combination of enzyme and algae extracts

زمان (ثانیه) Time (S)	جذب Absorption				
	آنزیم Enzyme	آنزیم+عصاره جلبک Enzyme+algae extract			
		پادینا-ماسیراسیون Maceration-Padina	پادینا-اولتراسونیک Ultrasonic- Padina	سارگاسوم-ماسیراسیون Maceration-Sargassum	سارگاسوم-اولتراسونیک Ultrasonic- Sargassum
0	1.058	0.976	0.927	1.027	0. 949
20	1.112	1.030	0.954	1.012	1.009
40	1.163	1.081	1.031	1.096	1.056
60	1.242	1.112	1.069	1.140	1.112
80	1.309	1.127	1.060	1.168	1.130
100	1.317	1.166	1.087	1.241	1.174
120	1.369	1.209	1.109	1.288	1.186

جدول ۷- درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره‌های جلبک‌ها

Table 7- The inhibition percentage of acetylcholinesterase enzyme by algae extracts

نوع عصاره جلبک Type of algae extract	مهار آنزیم استیل کولین استراز AchE nhibitory (%)
پادینا-ماسیراسیون Maceration- Padina	31.2±0.72[b]
پادینا-اولتراسونیک Ultrasonic- Padina	42.56±0.40[a]
سارگاسوم-ماسیراسیون Maceration- Sargassum	11.63±0.81[d]
سارگاسوم-اولتراسونیک Ultrasonic- Sargassum	25.06±0.11[c]



شکل ۳- فعالیت مهار نیتریک اکسید در حضور غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره جلبک
Fig. 3- Nitric oxide scavenging activity of different concentration of algae extract (mg/ml)

نیتریک اکسید واسطه مولکولی بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند گشادی عروق، التهاب، ترومبوز، ایمنی و انتقال عصبی شده و به وسیله‌ی مهار NADPH آرژینین، اکسیژن، و NOS می‌باشد. نیتریک اکسید، توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ساخته انقباض عضله صاف عروق، تجمع پلاکتی و چسبندگی لکوسیت‌ها به اندوتلیوم در هومئوستاز عروق شرکت دارد. تشخیص NO با اسپکتروفتومتری است که نیتریت تولید شده توسط اکسیداسیون نیز می‌تواند برای آنالیز نیترات از طریق کاهش کاتالیزوری آن به نیتریت استفاده شود (Lin *et al.*, 2017). بر اساس روش گریس ، کیت Natrix™ شناسایی ترکیباتی مانند سرم، پلاسما، بافت هموژنه و لیزسلولی را فراهم می‌کند. در این روش مقدار نیتریک اکساید به طور غیرمستقیم سنجیده می‌شود بدین صورت که اسیدسولفانیلیک به واسطه واکنش با نیتریت در محلول اسیدی یک رنگ آزو را تشکیل می‌دهد که می‌تواند در جذب نوری ۵۲۰ تا ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شود. نیتریک اکساید توسط سلول‌های اندوتلیال و با استفاده از اسید آمینه آرژینین و ملکول اکسیژن و به وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ساخته می‌شود. نیتریک اکساید رادیکال آزادی است که به وسیله آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتازه تولید می‌شود. نیتریک اکساید از اکسیداسیون درون سلولی اسید آمینه آرژنین به وسیله نیتریک اکساید سنتازها تولید می‌شود. نیتریک اکساید در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله تنظیم گشادی و تنگی عروق، ارتباط سلول‌های عصبی و پاسخ‌های ایمنی شرکت دارد. نیتریک اکساید به شدت ناپایدار است و در اثر اکسیداسیون به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که نیتریک اکساید با بیولوژی تومور و رگزایی ارتباط و اثرات متقابل پیچیده‌ای دارد (Varshney *et al.*, 2018).

لین و همکاران (Lin *et al.*, 2017) گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای سولفات‌دار *Sargassum fulvellum* در پاکسازی NO پاکسازی DPPH قویتر از آنتی‌اکسیدان‌های تجاری مثل آلفا توکوفرول هستند. استفاده از مهارکننده‌های ساخت نیتریک اکساید باعث تضعیف اثرات فوق گردیده و تحریک‌پذیری نورون‌های بعد سیناپسی افزایش می‌یابد. با توجه به آثاری که سیر از طریق تنظیم نیتریک اکساید در بدن دارد. مطالعاتی مختلف، اثر آن را بر نیتریک اکساید در نمونه‌ها و مدل‌های گوناگون بررسی کرده‌اند (Lin *et al.*, 2017). فوجی و همکاران (Fujii *et al.*, 2004) اثر عصاره سیر و ماده ایمونو مدولاتور آن را بر میزان تولید نیتریک اکساید و IL-۱۲ توسط ماکروفاژهای صفاقی موش های balb/c آلوده به لشمانیوز بررسی کردند؛ در این مطالعه، موش‌های آلوده به انگل با گذراندن دوره درمانی هفت روزه با عصاره سیر و ماده ایمونو مدولاتور آن درمان شدند. ماکروفاژهای صفاقی کشت داده شد. نتایج سنجش نیتریک اکساید با روش گریس نشان دادند، ماکروفاژهای صفاقی در گروهی که عصاره سیر را دریافت کردند، تولید نیتریک اکساید را تا دو برابر گروه کنترل افزایش دادند؛ اغلب مطالعات انجام شده، اثر زودگذر و آنی عصاره‌ها را بر سطح نیتریک اکساید سنجیده‌اند و کمتر مطالعه‌ای، آثار بلند مدت بر سطح این متابولیت را مورد بررسی قرارداده است. با توجه به آثاری که سیر بر سیستم ایمنی و اعصاب دارد، نیاز تعیین ماندگاری اثر عصاره در بدن و لزوم مشخص کردن اثر دراز مدت بر سطح نیتریک اکساید، به خوبی روشن است (Fujii *et al.*, 2004). نتایج آزمایش ما نشان می‌دهند که در روش گریس

به تنهایی، حجمی بالا از نیتریک اکساید موجود در نمونه سرمی قابل تشخیص و سنجش نیست و با توجه به نقش استونیتریل، هم به عنوان احیاکننده نیترات به نیتریت و هم به عنوان رسوب‌دهنده پروتئین موجود در سرم، می‌توان ادعا کرد که روش گریس همراه با استونیتریل، روشی مناسب‌تر و قابل استناد تر برای سنجش نیتریک اکساید در ترکیبات است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان ذکر کرد که هر دو روش عصاره‌گیری دو جلبک به خوبی در شرایط آزمایشگاهی توانستند از رشد سویه‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند که البته روش اولتراسونیک بر روش ماسیراسیون برتری داشت. فعالیت ضدمیکروبی عصاره اولتراسوندی پادینا به مراتب بیشتر بود. از آنجایی که باکتری لیستریا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی است، و با توجه به ترکیبات شناسایی شده و خواص آنتی‌اکسیدانی، به نظر می‌توان از ترکیب عصاره جلبک‌ها به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره گرفت. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های گسترده‌ای چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در ماده غذایی انجام گیرد. در یک جمع بندی کلی می‌توان بیان کرد که عصاره‌های جلبک دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند. وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره‌ها تایید شد. پیشنهاد می‌گردد با آزمون‌های بالینی به صورت گسترده‌تر انجام گیرد تا بتوان از پتانسیل بالقوه جلبک‌های پادینا و سارگاسوم در صنایع غذایی و داروسازی بهره‌مند شد.

منابع

1. Cox, S., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, *17*(1), 205-220. https://doi.org/10.21427/D7HC92.
2. Duarte, M.E., Cardoso, M.A., Noseda, M.D., & Cerezo, A.S. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed Sargassum stenophyllum. *Carbohydrate Research*, *333*(4), 281-293. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00149-5.
3. Yende, S.R., Harle, U.N., & Chaugule, B.B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species. *Pharmacognosy Reviews*, *8*(15), 1. https://doi.org/10.4103/0973-7847.125514.
4. Latifi, A. M., Sadegh Nejad, E., & Babavalian, H. (2015). Comparison of extraction different methods of sodium alginate from brown alga *Sargassum* sp. localized in the Southern of Iran. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *2*(2), 251-255.
5. Amini, F., Riahi, H., & Zolgharnain, H. (2013). Metal concentrations in *Padina* species and associated sediment from Nayband Bay and Bostaneh Port, northern coast of the Persian Gulf, Iran.
6. Rohani-Ghadikolaei, K., Abdulalian, E., & Ng, W.K. (2012). Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(6), 774-780. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0220-0.
7. Devi, K.N., Kumar, T.T., & Balasubramanian, T. (2014). Antibacterial and antioxidant effects from seaweed, *Sargassum wightii* (Greville, 1848) against marine ornamental fish pathogens. *Journal of Coastal Life Medicine*, *2*(10), 773-83.
8. Kordjazi, M., Etemadian, Y., Shabanpour, B., & Pourashouri, P. (2019). Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of fucoidan extracted from two species of brown seaweeds (*Sargassum ilicifolium* and *S. angustifolium*) around Qeshm Island. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *18*(3), 457-475. https://doi.org/10.22092/IJFS.2018.11549.
9. Hlila, M.B., Hichri, A.O., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., & Mastouri, M. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of *Padina pavonica* and *Enteromorpha* sp. from the Tunisian Mediterranean coast. *Journal of Coastal Life Medicine*, *5*, 336-342.
10. Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, *133*, 58-64. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025.
11. Pezeshkpour, V., Khosravani, S.A., Ghaedi, M., Dashtian, K., Zare, F., Sharifi, A., & Zoladl, M. (2018). Ultrasound assisted extraction of phenolic acids from broccoli vegetable and using sonochemistry for preparation of MOF-5 nanocubes: Comparative study based on micro-dilution broth and plate count method for synergism antibacterial effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, *40*, 1031-1038. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.09.001.
12. Hameed, I.H., Hussein, H.J., Kareem, M.A., & Hamad, N.S. (2015). Identification of five newly described bioactive chemical compounds in methanolic extract of Mentha viridis by using gas chromatography-mass

spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, *7*(7), 107-125. https://doi.org/10.5897/JPP2015.0349.

13. Papandreou, M.A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z.I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margarity, M., & Lamari, F.N. (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research*, *198*(2), 352-358. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.013.
14. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10*(3). https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748.
15. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
16. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*(2), 88-95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.
17. Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Vasiee, A., & Mortazavi, S.A. (2018). Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *114*: 449-452. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.033.
18. Noshad, M., Hojjati, M., & Behbahani, B.A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 153-157. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.026.
19. Ferrazzano, G.F., Scioscia, E., Sateriale, D., Pastore, G., Colicchio, R., Pagliuca, C., & Pagliarulo, C. (2017). In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. *BioMed Research International*. https://doi.org/10.1155/2017/2152749.
20. Abdel-Aal, E.I., Haroon, A.M., & Mofeed, J. (2015). "Successive solvent extraction and GC-MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green Alga *Spirogyra longata*." *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *41*(3), 233–46. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.06.001.
21. Sarpal, A.S., & Costa, I.C.R. (2016). Investigation of Biodiesel Potential of Biomasses of Microalgaes Chlorella, Spirulina and Tetraselmis by NMR and GC-MS Techniques. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, *06*(01), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.06.001.
22. Avula, S.G.C., Belovich, J.M., & Xu, Y. (2017). Determination of fatty acid methyl esters derived from Algae *Scenedesmus dimorphus* Biomass by GC–MS with one-step esterification of free fatty acids and transesterification of glycerolipids. *Journal of Separation Science*, *40*(10), 2214–27. https://doi.org/10.1002/jssc.201601336
23. Barbalace, M. C., Malaguti, Giusti, L., Lucacchini, A., Hrelia, S., & Angeloni, C. (2019). Anti-inflammatory activities of marine algae in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12), https://doi.org/10.3390/ijms20123061.
24. Boi, V.N., Dang, X. C., & Phan, T. K. V. (2016). Effects of extraction conditions over the Phlorotannin content and antioxidant activity of extract from brown algae *Sargassum serratum* (Nguyen Huu Dai 2004). *Free Radicals and Antioxidants*, *7*(1), 115–22. https://doi.org/10.5530/fra.2017.1.17
25. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review." *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–60. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
26. Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., & Núñez, M. J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *7*(8), 3210–16.
27. Fujii, T., Y. Gao, R., Sharma, E.L., Hu, DenBaars, S.P., & Nakamura, S. (2004). Increase in the extraction efficiency of GaN-based light-emitting diodes via surface roughening. *Applied Physics Letters*, *84*(6), 855–57. https://doi.org/10.1063/1.1645992
28. Gaysinski, M., Ortalo-Magné, A., Thomas O.P., & Culioli, G. (2015). *Springer Protocols, Natural Products from Marine Algae*, 2, 207-223. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8-13.
29. Hielscher-Michael, S., Griehl, C., Buchholz, M., Ulrich Demuth, H., Arnold, N., & Ludger, A.W. (2016). Natural products from microalgae with potential against Alzheimer's disease: Sulfolipids Are Potent Glutaminyl Cyclase inhibitors. *Marine Drugs*, *14*(11), 203. https://doi.org/10.3390/md14110203.
30. Hlila, M.B., Majouli, K., Jannet, H.B., Mahjoub, A., Mastouri, M., & Selmi, B. (2017). Antimicrobial activity of Tunisian *Euphorbia paralias* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *7*(7), 629–32. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.008.

31. Kausalya, M., & Narasimha Rao, G. M. (2015). Antimicrobial activity of marine algae. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *6*(1), 78–87.
32. Lin, H.W., Liu, C.W., Yang, D.J., Chen, C.C., Shih Yin, C., Jung Kai T., Tien Jye C., & Yuan Yen, C. (2017). Dunaliella salina alga extract inhibits the production of Interleukin-6, Nitric Oxide, and Reactive Oxygen species by regulating nuclear factor-KB/Janus Kinase/Signal Transducer and activator of transcription in Virus-infected RAW264.7 Cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(4), 908–18. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.018
33. Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J.V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in Algal food products. *Molecules*, *20*(1), 1118–33. https://doi.org/10.3390/molecules20011118
34. Mekinić, I. G., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Perković, Z.P. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, *9*(6), 244. https://doi.org/10.3390/biom9060244.
35. Moein, S., Moein, M., Ebrahimi, N., Farmani, F., Sohrabipour, J., & Rabiei, R. (2015). Extraction and determination of protein content and antioxidant properties of ten algae from Persian Gulf. *International Journal of Aquatic Science*, *6*(2), 29–38.
36. Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2019). Macroalgae as a valuable source of naturally occurring bioactive compounds for the treatment of Alzheimer’s disease. *Marine Drugs*, *17*(11), 609. https://doi.org/10.3390/md17110609.
37. Olasehinde, T.A., Olaniran, A.O., Okoh, A.I., & Koulen, P. (2017). Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer’s disease. *Molecules*, *22*(3), 480. https://doi.org/10.3390/molecules22030480.
38. Otero, P., Quintana, S. E., Reglero, G., Fornari, T., & García-Risco, R. M. (2018). Pressurized liquid extraction (PLE) as an innovative green technology for the effective enrichment of Galician algae extracts with high quality fatty acids and antimicrobial and antioxidant properties. *Marine Drugs*, *16*(5), 156. https://doi.org/10.3390/md16050156.
39. Patil, P.D., Dandamudi, K.P.R., Wang, J., Deng, Q., & Deng, S. (2018). Extraction of bio-oils from Algae with supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, *135*, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.019.
40. Rathnayake, A.U., Abuine, R., Kim, Y.J., & Byun, H.G. (2019). Anti-Alzheimer’s materials isolated from marine bio-resources: a review. *Current Alzheimer Research*, *16*(10), 895–906. https://doi.org/10.2174/1567205016666191024144044.
41. Silva, A., Silva, S.A., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Gullón, P., Barroso, M.F., Prieto, M.A., & Simal-Gandara, J. (2020). Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: extraction and applications. *Antibiotics*, *9*(10), 1–41. https://doi.org/10.3390/antibiotics9100642.
42. Uysal, S., Aktumsek, A., Picot, C.M.N., Sahan, A., Mollica, A., Zengin, G., & Mahomoodally, M.F. (2017). A comparative: in vitro and in silico study of the biological potential and chemical fingerprints of *Dorcycinum pentapyllum* Subsp. Haussknechtii using three extraction procedures. *New Journal of Chemistry*, *41*(22), 13952–60. https://doi.org/10.1039/C7NJ03497K.
43. Varshney, P., Beardall, J., Bhattacharya, S., & Wangikar, P.P. (2018). Isolation and biochemical characterisation of two thermophilic green algal species- asterarcys Quadricellulare and Chlorella Sorokiniana, which are tolerant to high levels of carbon dioxide and nitric oxide. *Algal Research*, *30*, 28–37. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.006.
44. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – a review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*(May), 538–49. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018.